

## 1. INTRODUÇÃO

Há muitos milhões de anos atrás, os procariontes primitivos desenvolveram uma membrana com capacidade de fazer processo fotoquímico que acarreta na conversão de energia. O processo criou organismos autotróficos na Terra, este utiliza do fenômeno fotoquímico que absorve energia radiante solar pelos cloroplastos. O processo é chamado de fotossíntese. Mas, estes organismos com processo desenvolveram e tornaram-se a base material e energética para evolução da vida. Porém, o processo resulta em dois produtos finais como o oxigênio e o carbono assimilado. O carbono dá origem aos carboidratos que são transformados em substratos universais para a respiração e ponto de início para as diversas biossínteses (Larcher 2006).

O processo fotoquímico é responsável pelo fornecimento de energia para o crescimento e o desenvolvimento das plantas. Assim, a germinação de sementes, o desenvolvimento da plântula, floração e frutificação são todos regulados pela luz ambiental (Ferri 1986). Então, a realização de síntese de moléculas, movimentação ou transformação de organelas e transporte de substâncias através de membranas exige vias metabólicas que canalizam o fluxo de energia (Ferri 1986). Desta maneira, o armazenamento de carbono absorvido durante fotossíntese ocorre através da transformação de carboidratos, compostos são produzidos em grande quantidade pelas plantas. Assim, estas apresentam reservas de carboidratos intracelulares como sacarose, os compostos da série rafínosica e frutanos, amido em amiloplastos do citoplasma e extracelulares como composição por polissacarídeos da parede celular (Buckeridge *et al.* 2007). Assim, a organogênese direta exige um fluxo de energia da planta para regeneração da planta e locais de reserva.

O presente trabalho buscou a identificação do carboidrato de reserva para organogênese direta e a verificação do melhor protocolo histoquímico nos locais de síntese e armazenamento do carboidrato para os centros meristemáticos para *Jacaranda ulei* Bureau & K. Schum.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O Brasil, um dos países de maior biodiversidade mundial (Vieira *et al.* 2002), apresenta seis grandes biomas: o **Costeiro**, a **Caatinga**, o **Amazônico**, o **Pantanal**, o **Pampa** e o **Cerrado sensu lato**. Sendo que o bioma Cerrado possui entorno de 2.000.000 Km<sup>2</sup>, o que representa de 23% do território brasileiro; oitenta por cento desta área está situada nos estados de Minas Gerais, Goiás, São Paulo, Mato Grosso e Distrito Federal (Ribeiro & Walter, 1998). Diferentes ecofisionomias são presentes neste Bioma Cerrado: Cerrado *sensu stricto*, cerradão, cerrado sujo, campo limpo, campo rupestre e de altitude (Rodrigues & Carvalho, 2001). Dentre as famílias que habitam o Bioma Cerrado, existe a família *Bignoniaceae*.

A família *Bignoniaceae* apresenta 120 gêneros (Joly 1983; Barroso *et al.* 1991) com 650 espécies pantropicais, predominantemente neotropicais e poucas distribuídas nas regiões temperadas (Barroso *et al.* 1991). Possui oito tribos, as quais três (*Crescentieae*, *Tecomeae* e *Bignoniaceae*) têm representantes em nossa flora (Barroso *et al.* 1999).

Na tribo *Tecomeae*, existe o gênero *Jacaranda* que possui 47 espécies (Gentry 1979), destas podem ter hábito arbóreo, arbustivo, subarbustivo ou trepador (Barroso *et al.* 1991). Estas espécies vivem em florestas e savanas e têm distribuição restrita à região neotropical (Gentry 1979; Vieira *et al.* 1992). Nas fitofisionomias do Cerrado são encontradas 20 espécies (Mendonça *et al.* 1998).

Este gênero possui a importância econômica que está relacionada principalmente às suas propriedades medicinais e paisagísticas. As medicinais das diferentes espécies deste gênero ocorrem, provavelmente, pela presença de substâncias químicas nos diversos órgãos como: flavonóides (Ferguson & Lien 1982), antocianinas (Fernande 1968; Billot 1974), terpenos (Ogura *et al.* 1975), quinonas (Subraman *et al.* 1973) e polissacarídeos (Singh 1997), entre outras (Dayal & Seshadri 1979; Prakash & Gard 1980).

Temos como exemplo a *Jacaranda mimosaeifolia* Don, a qual é utilizada no México na ornamentação de jardins públicos; ainda, a população local utiliza suas flores na forma de chá, para dores em geral (Pérez-González *et al.* 1994). No Brasil, também na forma de chás, são utilizadas as folhas de *Jacaranda caroba* (Vell.) DC., no tratamento do reumatismo, sífilis, doenças da pele e como tônico. Além disso, a casca da raiz tem ação sudorífera e a casca do caule é adstringente, diurética e também anti-sifilítica (Rodrigues & Carvalho 2001; Oliveira 2002). Deste modo, as folhas e a casca do caule de *Jacaranda decurrens* Cham. São utilizadas como

depurativo e nas afecções cutâneas e as folhas secas, na forma de cataplasmas no tratamento de úlceras externas (Rodrigues & Carvalho 2001).

*Jacarandá ulei* é uma das espécies do gênero que ocorre no cerrado. Esta é uma espécie subarborescente, nativa do Cerrado (Mendonça *et al.* 1998), popularmente conhecida como caroba (Barros 1981), carobinha e carobinha do campo (Farias *et al.* 2002). É utilizada na medicina popular para tratar problemas de reumatismo e dores na coluna (Barros 1981; Mattos 1996). Atualmente, as folhas já são comercializadas em farmácias, que as indicam também para afecções da pele e vias urinárias e para disenteria amebiana. Além da ação terapêutica, a espécie apresenta grandes potenciais ornamentais e apícolas, devido à tonalidade do verde de suas folhas e da coloração púrpura das suas flores, ainda rica em pólen e néctar. Esta espécie produz de 10 a 30 cápsulas por planta. Dentro destas cápsulas, existem 30 a 50 sementes.

De acordo com a literatura, a propagação é realizada por sementes, às quais apresentam porcentagens de germinação entre 55% e 77% (Wetzel 1997; Noletto 2003; Ribeiro 2003), de acordo com a capacidade germinativa dos lotes e também com as condições de cultivo. De acordo com Wetzel (1997) e Salomão *et al.* (2004), a viabilidade inicial ( $63\% \pm 29$ ) não diminui após dessecação ( $60\% \pm 23$ ), indicando que as sementes são ortodoxas. Entretanto, segundo Lorenzi (1992), é comum no gênero que as sementes permaneçam viáveis até quatro meses. Desta forma, o período de viabilidade pode estar ligado às condições de armazenamento.

## 2.1. A REGENERAÇÃO E A TOTIPOTÊNCIA

Cerca de 50% das espécies herbáceas e arbustivas dos cerrados brasileiros possuem órgãos subterrâneos espessados (Mantovani 1983). Estes órgãos apresentam funções primordiais de regeneração da parte aérea e/ou propagação vegetativa e de reserva (Apezzato-da-Glória 2003).

A totipotência que é uma propriedade apresentada pelas células vegetais, ou seja, grande potencial de uma célula regenerar e formando uma nova planta, quando submetidas a tratamentos adequados (Kerbaudy, 1999). Essas células voltam a rediferenciação, que podem induzir à formação de embriões somáticos (embriogênese somática) ou a formação de gemas (organogênese), (Sugiyama, 2000).

No século XX, a descoberta da química do material genético, a decifração e divulgação do conhecimento do código genético possibilitaram novas tecnologias que reduzem o tempo necessário para obtenção de novas plantas melhoradas.

Neste contexto, para utilização da micropropagação para multiplicação das espécies são necessárias pesquisas relacionadas à morfogênese das espécies. Para tal, buscam o estabelecimento de novos protocolos de cultura e que podem determinar pelas análises histológicas dos tipos celulares, dão origem as gemas caulinares (Matsumoto *et al.*, 1996). Porém, organogênese depende de um sistema de regeneração de plantas *in vitro* através das técnicas de culturas de tecidos.

A regeneração *in vitro* via organogênese é um processo que envolve desenvolvimento de centros meristemáticos,, conhecidos como meristemoídes (Ramage e Williams, 2002). As células dos meristemoídes são responsáveis pela expressão da via organogênica *in vitro*. Estas podem ser convertidas diretamente em um meristemoíde, este processo é chamado de organogênese direta ou adventícia, podem apresentar formações de calos antes da formação do centro, agora chamada de organogênese indireta. A organogênese direta é mais indicada para obtenção de plantas transgênicas (Apezzato-da-Glória & Machado, 2004). Mas, condições de cultura apropriadas podem permitir retomar um estado homogêneo, produzindo plantas geneticamente mais estáveis. Contudo, o processo de organogênese necessita de alguma forma de energia para desenvolver a competência e determinação da regeneração (Peres, 2002). Desta maneira, a energia é fornecida em forma de carboidratos para esse processo.

Assim, ao longo de mais de 400 milhões de anos de evolução das plantas terrestres, estas sintetizam carboidratos como reserva de energia para seu desenvolvimento. Os principais carboidratos são polissacarídeos; a sacarose e o amido. A sacarose é a forma de açúcar transportado nas plantas, de modo geral; e, o amido tem sido utilizado como principal composto de reserva. Entretanto, a concentração de sacarose para crescimento ótimo é de 12-18%, principalmente, para desenvolvimento de embriões nos estágios iniciais em cultura de embriões (Caldas *et al.* 1998). Então, servindo este como fonte de energia para desenvolvimento inicial da planta e tendo como produto de sua lise, a maltose e a glicose, que estão presentes tanto nas frações de amilose e também nas frações de amilopectina (Badenhuizen 1965). Devido a isto, este polissacarídeo é ingerido em qualquer alimento de origem vegetal que não tenha em sua composição este polissacarídeo. Logo, tem sido utilizado não somente como uma reserva para a própria planta, mas também como uma rica fonte de carboidratos e energia para os níveis subseqüentes da cadeia alimentar nos ecossistemas. Assim, ao longo da evolução vários organismos, desde os microorganismos, passando por fungos, leveduras e algas desenvolveram a capacidade de produzir enzimas que ou sintetizam ou degradam o amido com subseqüente liberação de glicose e uso no metabolismo energético. Portanto, o amido

é um dos compostos de maior importância para o fluxo de energia através dos ecossistemas em nosso planeta.

## 2.2. AMIDO

O amido é armazenado na forma de grãos insolúveis em água que são encontrados em organelas especiais chamados de amiloplastos, que são encontrados em vários tecidos e órgãos não fotossintetizantes como parênquima de raízes e caules, tubérculos, endosperma ou cotilédones de sementes e também podem formar-se transitoriamente nos cloroplastos das folhas. Dependendo do órgão e da espécie em estudo, podem-se encontrar grãos de amido de diferentes tamanhos, formas e tipos. Por exemplo, os de batata são grandes, mas os de arroz e trigo sarraceno estão entre os menores grãos já encontrados. A forma dos grânulos é bastante variável, resultando em grande variação de área superficial em relação à massa. Além disso, recentemente foi demonstrada a presença de poros, como observado em milho, aos quais se atribui à iniciação da lise enzimática *in vivo*. A forma dos grãos pode ser elíptica, esférica, angular ou irregular e esta é determinada, pelo menos em parte, pela proporção de amilose. Quanto maior for a quantidade de amilose, mais esférico é o grão (Bewley & Black, 1986). De uma maneira geral, podemos classificar os grãos de amido em dois tipos principais: os transitórios e os de reserva. Os grãos de amido transitórios são menos compactados e a forma é menos definida do que o amido de reserva. Nos cloroplastos, o amido é produzido durante o período fotossintético sendo rapidamente metabolizado durante o período noturno. Em sementes de leguminosas que armazenam galactomananos como principal reserva, (p.ex. guar, feno-grego, feijão-do-mato e *Sesbania*) os produtos de degradação do galactomanano são estocados transitoriamente como amido durante a germinação e desenvolvimento da plântula (Buckeridge *et al.* 2000). Por outro lado, os amidos de reserva de sementes como trigo, milho e arroz são compactos, bem definidos, possuem baixa taxa de renovação, sendo acumulados em amiloplastos, onde são estocados por longos períodos de tempo (Avigad & Dey, 1997).

Os amiloplastos para tornarem-se visíveis, precisam passar por processos histoquímicos. Existem vários estudos sobre o amido de plantas cultivadas. Entretanto, as caracterizações histoquímicas de organogênese *in vitro* foram pouco estudadas em plantas nativas do Cerrado. Segundo Polizeli (2002) a técnica Ácido periódico-Schiff (PAS), é muito utilizada para localização de amido e glicoproteínas das membranas celulares. Desta forma, utilizando de métodos histoquímicos PAS e solução de Lugol, podem-se ter uma melhor compreensão dos sistemas subterrâneos

do Cerrado. Assim, podemos conhecer as funções primordiais de regeneração da parte aérea, propagação vegetativa (Appezato-da-Glória 2003) e reserva, sendo, portanto, fundamentais para a sobrevivência destas espécies.

A espécie em estudo apresenta, em condições naturais, sistema subterrâneo capaz de formar gemas adventícias e que esta característica é comum em cerca de 50% das espécies herbáceas e arbustivas dos cerrados brasileiros (Mantovani 1983).

Segundo Raju *et al.* (1966), a ocorrência de raízes gemíferas em algumas dicotiledôneas está intimamente relacionada à estratégia de sobrevivência. Portanto a emissão de gemas e formação de ramos ocorre devida à forte perturbação ambiental.

Diante do exposto, a síntese e acúmulo de substâncias de reserva na organogênese *in vitro* de *Jacaranda ulei* a partir de explantes radiculares poderá auxiliar no desenvolvimento de novas cultivares.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Coleta do material botânico**

As coletas foram realizadas durante o período de frutificação dos anos de 2008 e 2009, a partir de indivíduos previamente selecionados, crescendo em condições naturais, no Setor Noroeste de Brasília (perto do Setor Militar Urbano).

A escolha dos locais de coleta foi determinada pela ocorrência da espécie *Jacaranda ulei*, com o mínimo de 05 (cinco) indivíduos, a partir dos quais foram coletadas 03 cápsulas por matriz (Figura 01).



**Figura 01** Plantas adultas de *Jacaranda ulei* durante seu ciclo anual no cerrado. (A) Planta com inflorescências púrpuras. (B) Planta com frutos imaturos.

As cápsulas deiscentes (frutos) foram coletadas no final do período de maturação, quando o epicarpo muda a coloração de verde para bege, porém ainda fechados. Ainda no local de coleta, os frutos foram colocados em sacos de papel (um por saco), com todas as informações necessárias à identificação da procedência das sementes.

## 3.2. Cultura de Tecidos

### 3.2.1. Coleta das sementes

As cápsulas fechadas foram colocadas em sacos de papel vedados e transportadas para o laboratório de Biologia da Universidade Federal do Pampa. Dois ou três dias após a coleta, quando os frutos abriam-se naturalmente, ainda dentro

dos sacos, as sementes foram liberadas. Desta forma, foram utilizadas 30 (trinta) sementes para germinação *in vitro*.

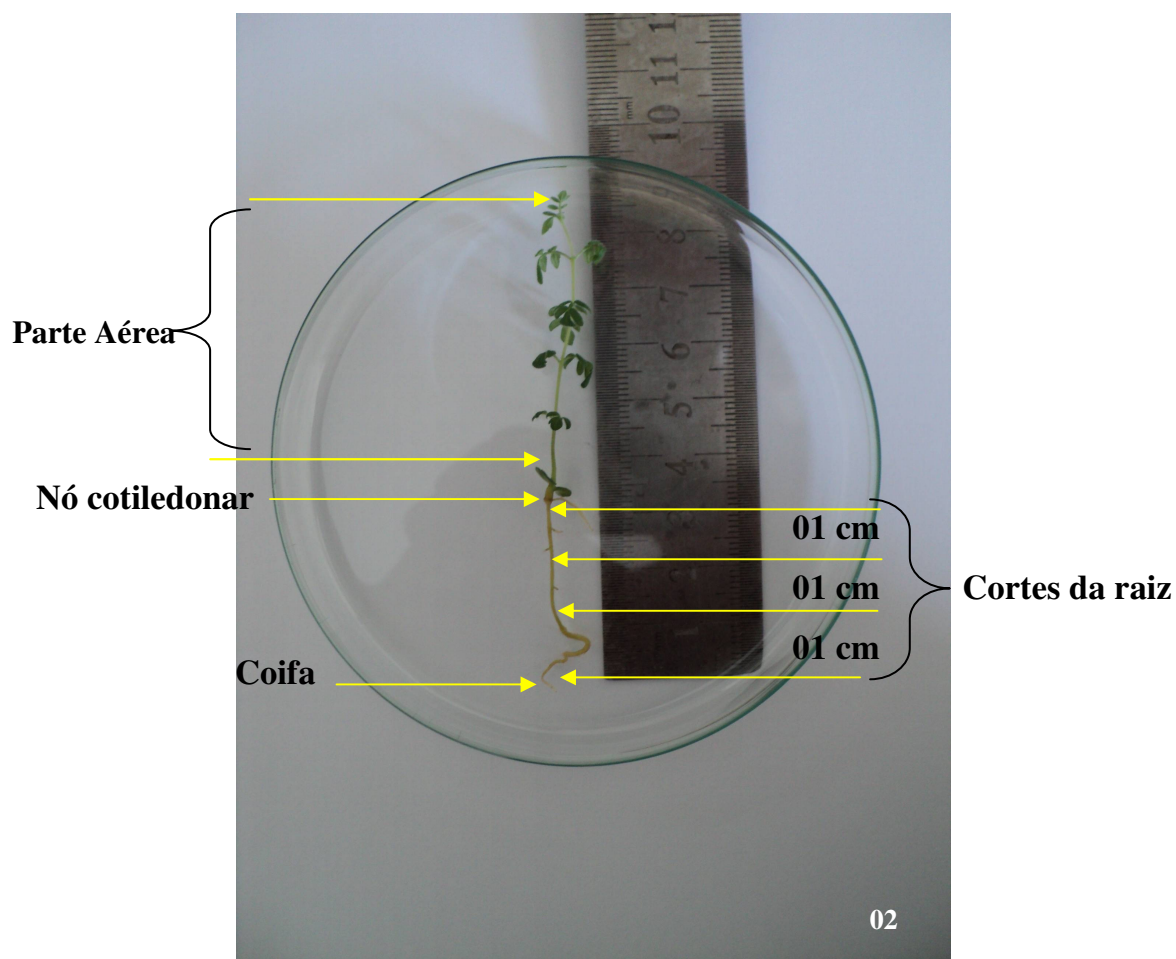
### **3.2.2. Desinfestação e inoculação de sementes**

A desinfestação das sementes foi realizada em capela de fluxo laminar horizontal. As sementes foram colocadas em tela fina e mergulhadas nos recipientes com seis banhos sucessivos; o primeiro com etanol 70%, com duração de 1 minuto, um banho de solução de hipoclorito de sódio a 2,5% de cloro ativo de duração de 10 minutos. Quatro banhos de água destilada e autoclavada (enxágües) para retirada do hipoclorito de sódio. Em seguida, foram selecionadas 30 (trinta) sementes e estas foram inoculadas em tubos de ensaio autoclavados (150 x 25 mm) sobre meio ágar-água (Noletto *et al.* 2003).

### **3.2.3. Estabelecimento das culturas *in vitro***

Os explantes radiculares foram retirados de plântulas com 30 dias, após germinação *in vitro* durante a fase anterior. Estes explantes foram retirados de raízes principais, com aproximadamente 05 centímetros de comprimento, sendo excisada, cada centímetro, de modo que o comprimento desses explantes fique entre 1,0 no máximo de 1,5 centímetros (Fig. 02).





**Figura 02** Apresenta plântula com regiões para retirada dos explantes radiculares.

### 3.2.3.1. Meio de Cultura

A espécie *Jacaranda ulei* foi multiplicada em solução nutritiva de  $\frac{1}{4}$  MS (Murashige & Skoog 1962). À solução nutritiva, foram adicionados reguladores de crescimento em concentrações de  $10 \text{ mg.L}^{-1}$  de 6-benzil-aminopurina (BAP) e  $10 \text{ mg.L}^{-1}$  de ácido indolil-3-butírico (AIB). O pH foi ajustado a 5,6. Posteriormente, foram acrescentados  $20 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose,  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de *mio*-inositol e solidificado com  $6 \text{ g.L}^{-1}$  de agar (Vetec).

A cultura foi mantida em tubos de ensaio na sala de crescimento com lâmpadas fluorescentes (Luz do Dia) de 40W com irradiância de  $30 \mu\text{moles /m}^2 \cdot \text{s}$  e foi mantida com fotoperíodo de 16 horas e temperatura de  $25 \pm 2^\circ$  Celsius durante desenvolvimento.

### 3.2.3.2. Estabelecimento

Os explantes radiculares foram incubados na solução nutritiva de  $\frac{1}{4}$  MS com hormônios vegetais de crescimento durante 09 (nove) dias. Três explantes foram retirados para cada dia e colocados em fixação na solução de formol, ácido acético e álcool 70°GL (FAA 70°).

#### **4. Estudo histoquímico dos grãos de amido dos explantes radiculares**

##### **4.1. Obtenção do material**

Os explantes radiculares foram inoculados *in vitro*, no meio  $\frac{1}{4}$  MS adicionado de  $10 \text{ mg.L}^{-1}$  BAP e  $10 \text{ mg.L}^{-1}$  AIB. Em diferentes dias de cultura [0 (controle - não inoculado), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9 dias], considerando que as gemas adventícias se formam na parte superior dos explantes, estas foram excisadas (aproximadamente 0,5cm) e fixadas. Foram analisadas três amostras de cada dia de cultura.

##### **4.2. Preparação histológica**

###### **4.2.1 Preparação histológica em Resina Technovit 7100**

As amostras foram fixadas em FAA 70° GL (formol, ácido acético e álcool 70° GL, 1v: 1v: 18v) durante 24 horas, desidratadas em série etílica até 95% (Johansen, 1940) e foram colocadas em solução de pré-infiltração (partes iguais de álcool 96° GL e resina líquida base Technovit 7100) durante 2 dias. Essas amostras foram colocadas em uma solução de infiltração, composta por endurecedor (1g de peróxido de benzoila) e resina líquida base Technovit 7100 (100 mL de meta-acrilato hidróxi-etil) durante 2 dias. Posteriormente, foram inseridas dentro de moldes plásticos com solução de polimerização. Estas foram confeccionados com 1 mL do endurecedor II (sulfóxido de dimetila) e 15 mL de preparação de solução. Os moldes com amostras foram colocados para secagem em estufa com temperatura de 60° C durante 24 horas. As amostras foram retiradas dos moldes e cada uma foi colada em bloco de madeira.

Após 24 horas de espera da secagem da cola, o material foi seccionado em cortes transversais de 10  $\mu\text{m}$  em micrótomo rotatório ANCAP. Os cortes seriados foram distendidos e aderidos às lâminas, utilizando água destilada e deixados sobre placa histológica a 37°C até secarem.

#### **4.2.2 Preparação histológica em Parafina**

Os cortes para estudo histoquímico foram excisados e fixados em FAA 70 °GL (formol, ácido acético e álcool 70 °GL, 1V:1V:18V) durante 24 horas (Johansen, 1940) e desidratados em série etílica, diafanizados em xilol, infiltrados e emblocados em parafina. O material emblocado foi seccionado em cortes transversais de 10 µm, estes foram obtidos em micrótomo rotatório ANCAP. Cortes seriados foram distendidos e aderidos nas lâminas, utilizando o adesivo da Haupt (Kraus & Arduin, 1997) e deixados sobre placa histológica a 42 °C até secagem.

#### **4.3. Preparação histoquímica**

##### **4.3.1 Solução de Lugol**

A solução de Lugol foi preparada com 0,75 g de iodo e 3,75g de iodeto de potássio, estes dissolvidos em 250 ml de água destilada (Lugol).

As análises das lâminas foram realizadas em microscópio Bioval modelo L2000C e as escalas preparadas adequadamente.

##### **4.3.2 Solução Reativa de Schiff (PAS)**

A solução foi preparada com 1,0 g de fucsina básica dissolvida em 200mL de água destilada aquecida a 40°C. A solução foi agitada durante 5 minutos e aguardou que se resfria a 37° C. Nesta temperatura, a solução de fucsina foi filtrada para béquer de 250mL. Em seguida, foi adicionada com 20 mL de HCl 1N e aguardou-se que temperatura abaixa-se a 25° C. Nesta temperatura, foi adicionado 01 grama de metabissulfito de potássio ( $K_2SO_5$ ) e a solução foi colocada na geladeira durante 24 horas. Em outro dia, foi adicionada 02 gramas de carvão ativado e a solução foi agitada durante 01 minuto. Então, esta foi filtrada em papel-filtro e aguardada em vidro escuro a 04° C na geladeira. Para utilização, foi retirada da geladeira e aguardou-se que a solução atingisse a temperatura ambiente (Polizeli 2002).

##### **4.3.3. Montagem em corantes**

Duas lâminas, em resina, para cada dia foram coradas com solução aquosa de fucsina básica 0,0125% durante 30 minutos a temperatura 45° C e 10 minutos de

Toluidina 1,0% em temperatura de 45° C. Uma vez efetuada a dupla coloração, as lâminas foram lavadas com dois enxágües em água corrente; logo após, secas em temperatura ambiente. Essas foram submetidas à montagem em resina sintética (Paiva *et al* 2006) e recobertas com lamínulas. Posteriormente, as lâminas foram fotomicrografadas e analisadas no microscópio Bioval Modelo L2000C e as escalas preparadas adequadamente.

#### **4.3.4. Estudo histoquímico em Lugol**

Nos cortes dos dias 0, 3, 6 e 9 foram utilizadas três lâminas em resina para o teste de amido e três lâminas para cada dia (0 a 9) emblocadas em parafina. A cada lâmina foi testada com uma gota de Lugol e uma lamínula para cada lâmina. O excesso de Lugol foi retirado com pedaço de papel-filtro.

#### **4.3.5. Estudo histoquímico em Reativo de Schiff (PAS)**

Os cortes do dia 0 ao dia 09 foram hidratados, estes transferidos para solução de ácido per-iódico durante 05 minutos. Lavaram-se os cortes em água destilada e colocou-se no reagente de Schiff por 15 minutos. Então, lavaram-se os cortes água corrente.

#### **4.4. Análise Estatística**

Foram realizados experimentos inteiramente casualizados para escolha das plântulas. Sendo realizados com quatro repetições de 25 tubos para germinação *in vitro*. Retirou-se quatro amostras de plântulas para cada dia, totalizando 36 plântulas com raízes por dia para inoculação no ¼ MS.. Destas foram selecionadas três amostras de plântulas para fixação, a infiltração de resina ou parafina e para cortes histológicos. Os cortes histoquímicos foram analisados com contagem de amiloplastos próximos da exoderme e endoderme. A análise dos resultados de amiloplastos foi feita através de análise de variância. A análise de variância apontou o valor de F foi significativo, utilizou-se o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). O software utilizado foi STATISTIX 7.0. As diferenças significativas foram representadas com letras diferentes seguidas das médias.

## 5. RESULTADOS DOS ESTUDOS HISTOQUÍMICOS

### 5.1. Morfologia Radicular

A raiz em secção transversal apresenta forma circular com epiderme multiseriada e a exoderme unisseriada, o parênquima cortical composto de oito a dez camadas de células parenquimáticas de parede delgada; sendo que até a quinta camada, são isodiamétricas, de tamanho médio. Após a quinta camada, o córtex apresenta células hipertrofiadas, e muitos espaços intercelulares. A endoderme é unisseriada. O cilindro vascular compreende de periciclo unisseriado, apresentando células de tamanho pequeno, comparando com as células hipertrofiadas do córtex.

O estelo é tetrarca, com quatro pólos de protoxilema alternados com floema, quando no crescimento primário (Fig. 03).

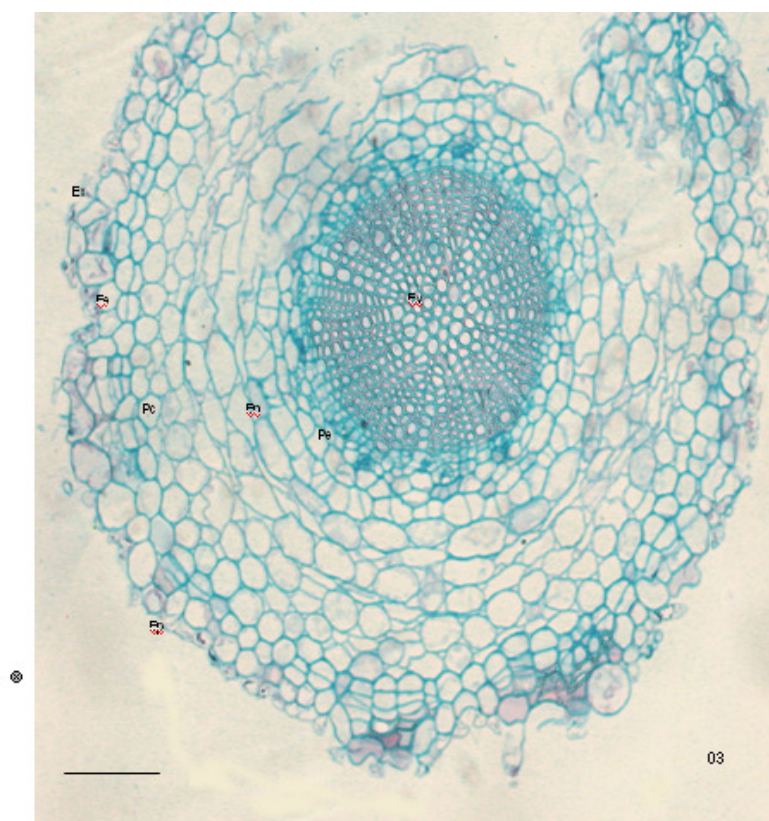
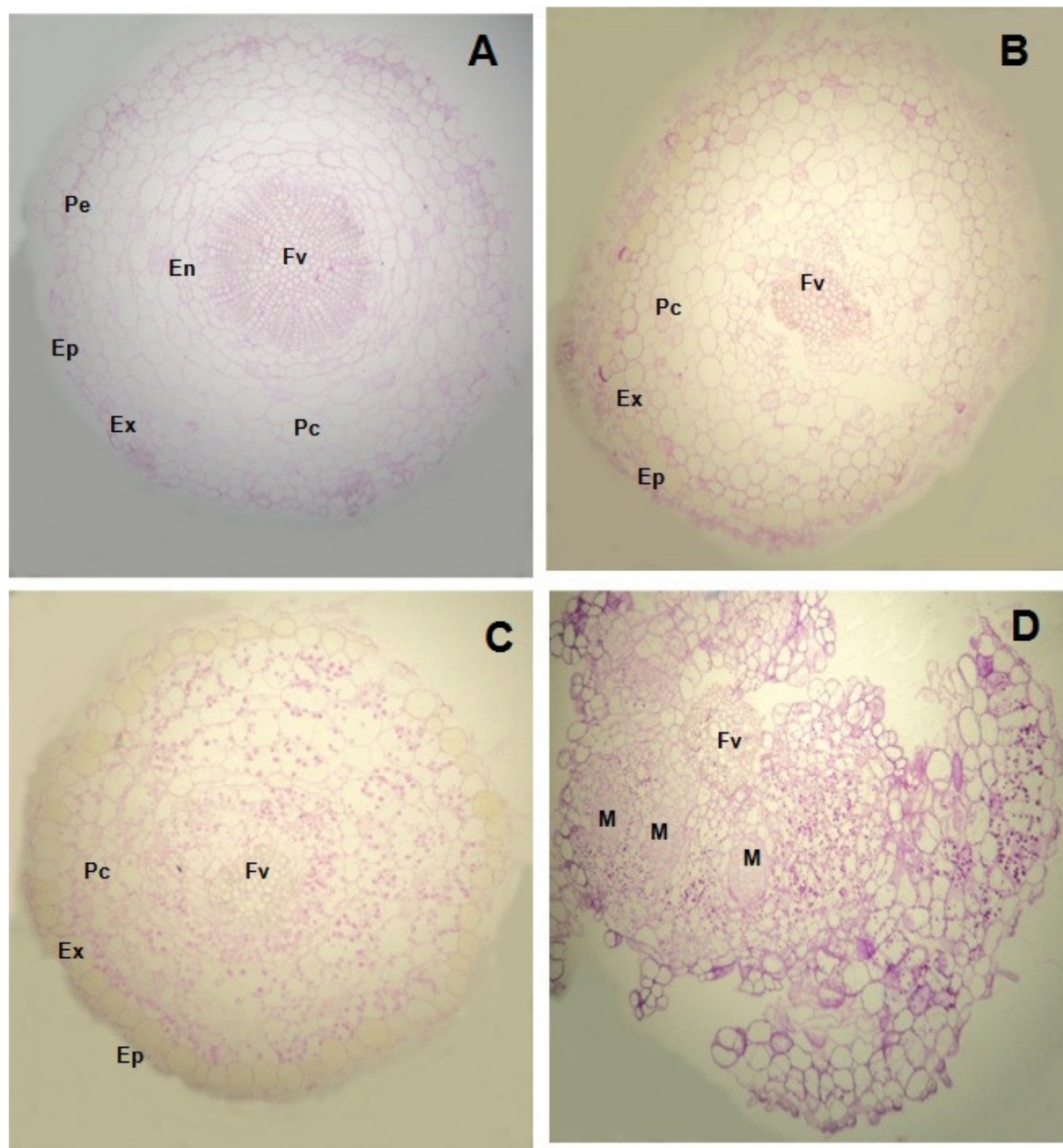


Figura 03 Corte transversal do dia zero (controle) de raiz com 30 dias. Epiderme (Ep), Exoderme (Ex), Periderme (Pe), Parênquima cortical (Pc), Endoderme (En), Periciclo (Pe) e Feixe vascular (Fv) (Barra 125  $\mu$ m).

### 5.2 Teste de Reagentes PAS



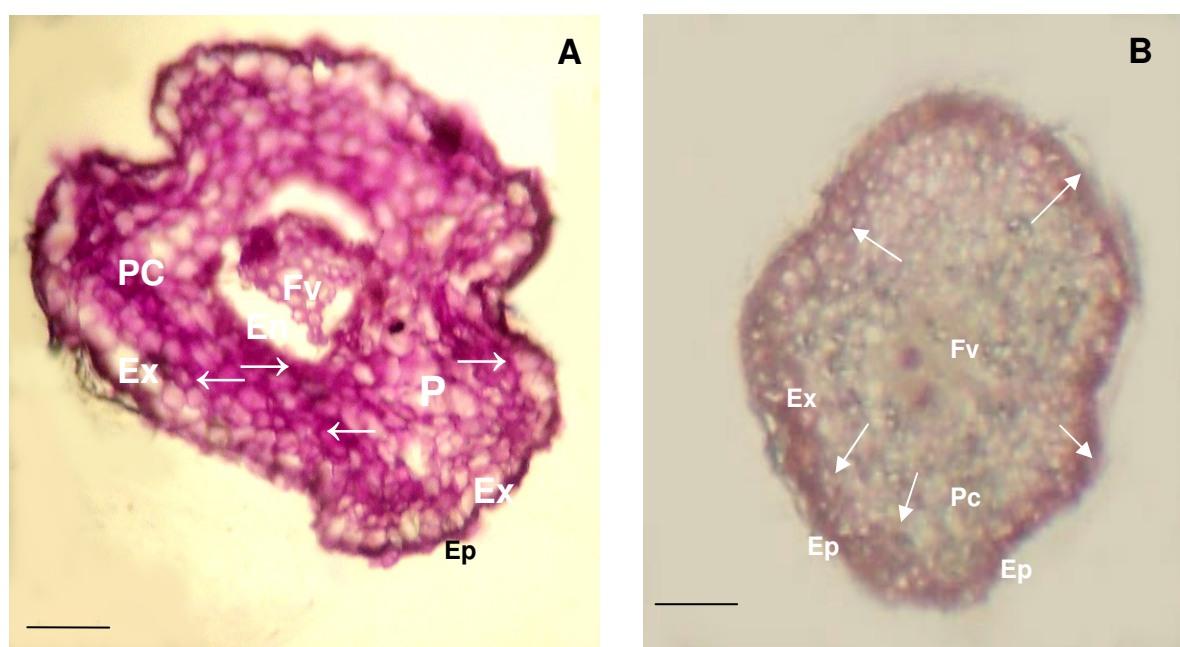
O desenvolvimento da organogênese de *Jacaranda ulei* foi evidenciado para o teste PAS com aumento na síntese de glicose, glicoproteínas e aumento do número de amiloplastos (Fig.04).



**Figura 04** Os cortes transversais da raiz de *Jacaranda ulei* com reagentes PAS, evidenciando-se células com paredes coradas, rica em glicoproteínas. (A) No dia 0, as células do parênquima cortical não apresentam amiloplastos. (B) Dia 3 apresentou poucos amiloplastos. (C) Dia 6 evidenciou muitos grãos de amido e (D) apresentou estrutura colapsada e meristemóides. Epiderme (Ep) Exoderme (Ex), Parênquima cortical (Pc), Periciclo (Pe), (En) endoderme, Feixe vascular (Fv) e Meristemóides(M). (Barra 100  $\mu$ m).

Constatou que as células parênquima cortical proximais da exoderme apresentam mais síntese de glicose e glicoproteínas. Também, as células da endoderme produzem glicoproteínas e glicose. Assim, evidência do principal local da síntese da glicose (Fig. 05 A).

As células subjacentes à exoderme da cultura do dia 03 para parafina, houve uma grande síntese de glicose, principalmente as duas camadas iniciais de células parenquimáticas isodiamétricas do córtex e existe visivelmente uma concentração de glicose nas paredes celulares. A partir da quinta camada, pode observar diminuição da coloração das células hipertrofiadas até a endoderme. Mas, o teste PAS mostrou que as duas camadas proximais da exoderme e da endoderme são ricas de glicose e glicoproteínas (Fig 05 B).



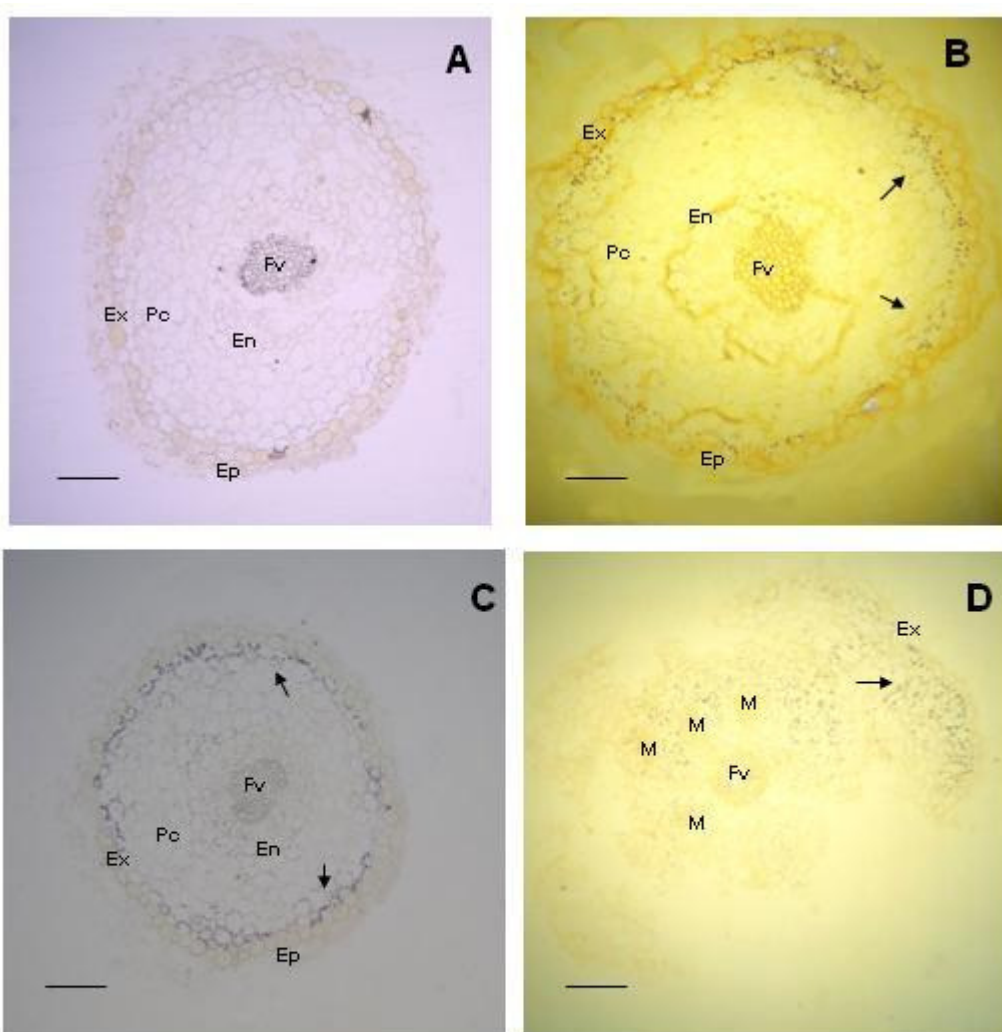
**Figura 05** Corte radicular transversal de *Jacaranda ulei* com reagentes PAS (dia 3). Parênquima cortical (Pc), Epiderme (Ep), Exoderme (Ex), Parênquima cortical (Pc) e Feixe vascular (Fv). (A) As membranas ricas em glicoproteínas apresentam muito coradas. (B) As camadas de células do parênquima mais próximas da exoderme apresentam ricas em glicose e glicoproteínas. As setas brancas (←) evidenciam intensa coloração das células com paredes ricas em glicoproteínas na proximal da exoderme e da endoderme (Barra 100  $\mu$ m).

As células subjacentes à exoderme da cultura do dia 03, houve formação e acúmulo de grânulos de amido, principalmente as duas camadas iniciais de células parenquimáticas isodiamétricas do córtex e existe visivelmente de hidrólise de amidos no Lugol. A partir da quinta camada, pode observar divisão das células hipertrofiadas.

(Fig 07). Mas, o teste PAS mostrou que as duas camadas proximais e da endoderme são ricas de glicose e glicoproteínas.

### 5.3. Teste de Reagentes Lugol

O sexto dia foi evidenciado lise de amidos das células de duas camadas de células do córtex e vários amiloplastos apresentaram dentro de pequenas células parenquimáticas que estão proximais das células hipertrofiadas. Estas células hipertrofiadas do parênquima cortical apresentam grande atividade de divisão, identificável como meristemóides (Figura 9).



**Figura 06** Os cortes transversais da raiz de *Jacaranda ulei* com reagente Lugol apresentam grãos de amido (amiloplastos). (A) No dia 0, as células do parênquima cortical apresentam poucos amiloplastos. (B) Dia 3 apresentou vários amiloplastos. (C) Dia 6 evidenciou muitos grãos de amido e (D) apresentou estrutura colapsada e meristemóides. Epiderme (Ep), Exoderme (Ex), Parênquima cortical (Pc), Periciclo (Pe), (En) endoderme, Feixe vascular (Fv) e Meristemóides (M). As setas demonstram os grãos de amido (→). (Barra 100 µm).



Na análise histológica das lâminas do 9º dia de cultura, foram observadas que células hipertrofiadas do parênquima cortical se dividiram e multiplicaram em células pequenas com núcleos grandes, de citoplasma denso, de pouco vacúolo e não possuem material de reserva. São conhecidas como meristemoídes que são diretamente convertidas em gemas (Kerbaudy 1998).

### 5.1.3 Análise estatística do número de amiloplastos

No estudo histoquímico, a análise da contagem dos números de amiloplastos para os testes do reagente PAS e o reagente Lugol para células próximas da exoderme não existiu uma diferença significativa entre essas. O reagente de Lugol demonstrou mais visível (Tab.1).

**Tabela 1: A média de amiloplastos próximos da exoderme.**

<b>Teste Histo químico</b>	<b>Média de números de amiloplastos</b>
01 (PAS)	199,94 a
02 (LUGOL)	294,36 a

n = 30

A análise da contagem dos números de amiloplastos para os testes do reagente PAS e o reagente Lugol para células próximas da endoderme não apresentou uma diferença significativa entre essas (Tab.2).

**Tabela 2: A média de amiloplastos próximos da endoderme.**

<b>Teste Histo químico</b>	<b>Média de números de amiloplastos</b>
01 (PAS)	144,13 a
02 (LUGOL)	123,07 a

n = 30

## 6. DISCUSSÃO

A *Jacaranda ulei* apresenta vários fatores anatômicos radiculares para sobrevivência da espécie no cerrado como epiderme multisseriada, exoderme unisseriada e parênquima cortical com dois tipos de células, as isométricas e hipertrofiadas. Segundo Scatena e Dias (2003) as reservas de amido constituir estratégia para sobrevivência de plantas que habitam ambientes com sazonalidade bem definida, neste aspecto, podem destacar as plantas xerófitas do cerrado. Assim, o ambiente apresenta com algum fator limitante para a propagação da espécie do período de seca.

Nos primeiros dias de micropropagação (0 a 3), existem grande acúmulo de amido próximo da exoderme, pois o sexto dia essa formação de grãos de amido evidenciados na endoderme. Assim, estes grãos são de formação transitória, que são menos compactados. Desta maneira, facilita a lise do amido.

A *Jacaranda ulei* apresentou várias regiões de formação dentro da zona de células hipertrofiadas corticais. Não observado característica aconteceu no estudo anatômico sobre a organogênese em segmentos radiculares de *Diospyros kaki* L., estes apresentaram uma única camada de células epidérmicas, parênquima cortical contendo grãos de amido, endoderme e periciclo, que se localizaram entre os feixes do floema e xilema. Desta forma, constatou-se uma organogênese direta e de origem endógena (Testsumura & Yukinaga 2000).

A espécie estudada apresentou organogênese direta nas células hipertrofiadas do parênquima cortical após a quinta camada de células do parênquima cortical. Segundo Kerbauy (1998), as plantas com raízes gemíferas formam gemas próximas dos pólos de protoxilema.

Sendo que a *Jacaranda ulei* apresenta xilopódio na fase vegetativa adulta. Contudo a fase inicial de desenvolvimento primário não foi observada estrutura mista, somente radicular. Esse é órgão de estrutura complexa, em geral, também órgão de reserva (amidos), de consistência rígida e capacidade gemífera (Appezato-da-Glória, 2003). A organogênese direta aconteceu em células hipertrofiadas, entre quinta a sétima camadas do parênquima cortical da espécie estudada até nono dia de cultura. Porém, as análises estruturais das células envolvidas na organogênese *in vitro* de *Bauhinia forficata* Link (sistema indireto) e *Glycine max* (L.) Merrill (sistema direto). Calos de *B. forficata*, após 30 dias de cultura, e meristemóides de *G. max*, após 10 dias de cultura. Também, a espécie *Passiflora cincinnata* Mast. apresentou organogênese direta, contudo os centros de origens a partir do periciclo (nas raízes com início da estrutura secundária) e a partir do câmbio vascular (com estrutura secundária estabelecida

Para a *Jacaranda ulei* a baixa concentração de citocinina do meio de cultura e baixíssima concentração de auxina facilitam a indução a organogênese direta. A espécie *Cataseum fimbriatum* ocorre à conversão de um meristema radicular em caule, devido que as raízes de orquídeas epífitas possuem características de caules, a presença de clorofila. No processo, existe uma grande acumulação de citocininas endógenas. A caracterização do metabolismo e sensibilidade hormonal favorável, e ainda pouca determinação pela espécie. Entretanto, Colli & Kerbauy (1993) mencionam que as espécies com competência para organogênese direta, a presença de citocinina no meio de cultura estimula a transformação das células corticais.

A síntese de grânulos de amido nas células próximas da exoderme e da endoderme, a lise do amido e síntese de glicose e glicoproteínas são visíveis, pela solução de Lugol e a solução de PAS, respectivamente, a partir do terceiro dia a nono dia. Estes resultados histoquímicos são facilmente visíveis, com a espécie estudada. Mas, Peres *et al.* (2002) menciona que proembriões ou meristemóides desenvolveram depois do sexto dia.

## **7. CONCLUSÃO**

O método com reagentes de Lugol apresentou melhor nitidez para grãos de amido nas células do parênquima cortical e auxiliando na identificação da substância de reserva (amido) para tecido radicular para lâminas de resina e parafina.

O teste de Reativo Schiff-ácido periódico (PAS) evidenciou o local de formação da glicose, as duas a três camadas de células parenquimáticas corticais (fonte) com deslocamento para regiões de meristemóides (dreno) e a composição da parede com glicoproteínas. Apesar de que não existiu diferença significativa entre os dois tipos de métodos.

Desta forma, o estudo histoquímico de amido de *Jacaranda ulei* caracterizou dois locais (da síntese e dos armazenamentos). Também, demonstrou os dois tipos de células parenquimáticas competentes; para formação inicial do amido e outra para formação de gemas.

O local da organogênese direta é parênquima cortical, precisamente, as células hipertrofiadas (quinta a oitava camadas de células corticais).

## **8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. & MACHADO, S.R. Ultrastructural analysis of in vitro direct and indirect organogenesis. **Revista Brasileiro de Botânica**, São Paulo, v.27, n. 3, p.429-437, Jul/Set. 2004.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; FERNAND, J.A. & VIEIRA, M.L.C. Considerações sobre a organogênese *in vitro* em *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg. In: IX Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal, 2003, Atibaia. **Resumos**. Campinas: Vieira Gráfica e Editora LTDA, v.15, p.176.
- AVIGAD, G. & DEY, P.M. 1997. Carbohydrate Metabolism: Storage Carbohydrates. In **Plant Biochemistry**, eds P.M. Dey & J.B. Harborne, Academic Press, San Diego. pp. 143-204.
- BADENHUIZEN, N. P. Occurrence and development of starch in plants. In: WHISTER, R.L. & PASCHALL, E. P. (Eds.) **Starch chemistry and technology: Fundamental aspects**. Academic Press. New York., 1965, p. 65-70.
- BARROS, M. Plantas medicinais – usos e tradições em Brasília – DF. VII Simpósio de Plantas Medicinais. Oréades, 1981/1982 . p.140 – 151.
- BEWLEY, J.D. & BLACK, M. 1986. **Seeds. Development and Germination**. Plenum Press, New York. 367 pp.
- BUCKERIDGE, M.S.; SANTOS, H.P. & TINÉ, M.A.S. 2000. Mobilisation in cotyledons of storage cell wall polysaccharides in seeds. **Plant Physiology & Biochemistry** 38: 141-156
- BUCKERIDGE, M.S.; MARTINI, L.C. & MACHADO, M.R. Respostas fisiológicas de plantas às mudanças climáticas: alterações no balanço de carbono nas plantas podem afetar o ecossistema? IN: REGO, G.M.; NEGRELLE, R. R. B. & MORELLATO, L. D. Z. **Fenologia - Ferramenta para conservação e manejo de recursos vegetais arbóreos**. Colombo-PR: Embrapa Florestas, 2007.
- BILLOT, J. Anthocyanin pigment evolution in flowers of Jacaranda. **Physiologie vegetale** 12 (2): 189-198, 1974.

- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P. & FERREIRA, M.E. 1998. Meios Nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L.S & BUSO, J. A . eds., **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Vol. 1. EMBRAPA Produção de Informação/Centro Brasileiro Argentino de Biotecnologia, Brasília, p. 87- 132.
- COLLI, S. & KERBAUY, J.G. Direct root tip conversion of Catasetum into protocorm-like bodies. Effects of auxin and cytokinin. **Plant Physiology**, v.65, p39-44, 1993.
- DAYAL, R. & SESHADRI, T. R. Chemical constituents of Jacaranda mimosifolia wood. **Journal of the Indian Chemical Society** 56 (12): 1269-1270, 1979.
- FARIAS, R. **Fitogeografia dos Gêneros Jacaranda Juss. e Tabebuia Gomes ex DC. no Bioma Cerrado**. 96 p. Brasília, 2000. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília.
- FERGUSON, N. M. & LIEN, E. J. J. A flavonol neohesperidoside from *Jacaranda acutifolia*. **Journal of Natural Products** 45 (5): 523-524, 1982.
- FERNANDE, M. E. Anthocyanins in flowers of *Jacaranda mimosaeifolia* Don and *Jacaranda semiserrata* Cham. **Anales de la Asociacion Química Argentina** 56 (3-4): 135-137, 1968.
- FERRI, M. G. **Fisiologia vegetal**. São Paulo: E.P.U Editora Pedagógica e Universitária, 1986. v.2, 401 p.
- GENTRY, A. H. Bignoniaceae of Southern Central America: Distribution and Ecological Specificity. **Biotropica** , 1979.v. 8 (2) : 117 – 131.
- JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. N.YORK. McGraw-Hill Book Co. Inc., 1940. 523p.
- KRAUS, J. E. & ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Seropédica-RJ: EDUR, 1997. 198 p.

- KRAUS, J. E. & MONTEIRO, W. R. Formation of protocorm-like bodies from apices of *Catasetum pileatum* (Orchidaceae) cultivated *in vitro*. 1. Morphological aspects. **Annals of Botany**. V.64, p.491-498, 1989.
- KERBAUY, G. B. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. *In*: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. & BUSSO, J. A. (Ed.). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: EMBRAPA – Produção de Informação /Centro Brasileiro Argentino de Biotecnologia, 1999. v.2, p. 519-531.
- LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: RiMa, 2004. 550p.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 2. ed. Nova Odessa, SP: Editora Plantarum, 1992. v.1, p.37-41.
- MANTOVANI, W. **Composição e similaridade florística, fenologia e espectro do cerrado da Reserva Biológica de Mogi-Guaçu, Estado de São Paulo**. Campinas, 1983. 147 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia) – Departamento de Ecologia, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- MATTOS, J. K. A. **Plantas Medicinais: Aspectos Agronômicos**. Edição do autor, 1996. 51 p.
- MATSUMOTO, T.K.; WEBB, D.T.; KUEHNLE, A.R. Histology and origin of somatic embryos derived from *Anthurim andraenum* Linden ex André Lamina. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, V. 121, P. 404-407, 1996.
- MENDONÇA, R. C.; FELFILI, J. M.; WALTER, B. M. T. ; JUNIOR, M. C. S.; REZENDE, A. V.; FILGUEIRAS, T. S. & NOGUEIRA, P. E. Flora vascular do Cerrado. *In*: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P.(Ed.). **Cerrado: ambiente e flora**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998. p.287-556.
- MURASHIGE, T. & SHOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v.15, p. 473- 497. 1962

- NOLETO, L. G.; RIBEIRO, M. F. & SILVEIRA, C. E. Germinação *in vitro* de sementes de *Jacaranda ulei* Bureau & K. Schum (BIGNONIACEAE). In: **Congresso Nacional de Botânica**, 54., 2003, Belém: Relação de trabalhos. Belém: UNAMA, 2003. CD-ROM.
- OGURA, M.; CORDELL, G. A. & FARNSWORTH, N. R. Triterpene acids of *Jacaranda caucana*. LLOYDIA- **The Journal Natural Products** 38 (6) : 539-539, 1975.
- PAIVA, J.G.A.; FANK-DE-CARVALHO; S.M., MAGALHÃES, M.D. & GRACIANO-RIBEIRO, D. Verniz vitral 500: uma alternativa de meio de montagem economicamente viável. **Acta bot. bras.** 20(2): 257-264. 2006.
- PERES, L. E. P. & KERBAUY, G. B. High cytokinin accumulation following root tip excision changes the endogenous auxin-to-cytokinin ratio during root-to-shoot conversion in *Catsetum fimbriatum* Lindl. (Orchidaceae) **Plant Cell Rep.**,18:1002-1006, 1999.
- PERES, L. E. P. Bases fisiológicas e genéticas da regeneração de plantas *in vitro*. **Biociência**, pp. 44-48, 2002.
- PÉREZ-GONZÁLES, C.; PÉREZ-GUTIÉRREZ, R. M. & PÉREZ-GUTIÉRREZ, S. *In vitro* Susceptibility of Pathogenic *Acanthamoeba castellanii* to *Jacaranda mimosaeifolia* extract. *Phyton-Revista Internacional de Botânica Experimental*, 1994. n.56, p.39-41.
- POLIZELI, M. de L. T. M. **Manual prático de Biologia Celular**. 2.ed. Ribeirão Preto: Holos Editora. 2008. 164p.
- PRAKASH ,L. & GARG, G. Chemical examination of the root barks of *Jacaranda mimosaeifolia* D Don and *Tabebuia pentaphylla* (Linn). **Hemsl pharmazie** 35 (10): 649-649, 1980.
- RAMAGE, C.M. & WILLIAMS, R.R. Mineral nutrition and plant morphogenesis. **In Vitro Cellular and Developmental Biology- Plant**, Gaithersburg, v. 38, n. 2, p. 116-124, Mar/ Apr. 2002.
- RIBEIRO, J. F. & WALTER, B. M. T. Fitofisionomias do bioma Cerrado In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P.(Ed.). **Cerrado: ambiente e flora**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998. p.87-166.

- RIBEIRO, M. de F. **Biologia reprodutiva e polinização de *Jacaranda ulei* Bureau & K. Schum. (BIGNONIACEAE)**. 196 p. Brasília, 2003. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília.
- RIZZINI, C.T.& HERINGER, E. P. Estudo sobre os Sistemas Subterrâneos Difusos de Plantas Campestres. *In*: SIMPÓSIO SOBRE O CERRADO, 2.,1966, Rio de Janeiro. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1966. v.38 suplemento, p.85-112.
- RODRIGUES,V.E.G & CARVALHO, D. 2001. **Plantas Medicinais no domínio dos Cerrados**, UFLA. P.49: 99:100:143:144.
- SALOMÃO, A. N.; SOUSA-SILVA, J. C.; DAVIDE, A. C; GONZÁLES, S.; TORRES, R. A. A.; WETZEL, M. M. V. S.; FIRETTI, F. & CALDAS, L. S. (Org.). **Germinação de sementes e produção de mudas de plantas do Cerrado**. Brasília: Rede de sementes do Cerrado, 2004. 97p.
- SINGH, R. B. Polysaccharide from *Jacaranda mimosaeifolia* seeds. **Asian Journal of Chemistry** 9 (2): 162-165, Apr-Jun 1997.
- SILVA, A. R. & MALLAVOLTA, E. A conquista do Cerrado. PATERNIANI, E.(Ed.). *In*: **Agricultura Brasileira e Pesquisa Agropecuária**. Brasília-DF: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 2000. p.31-43.
- SUBRAMAN, S. S.; NAGARAJA, S. & SULOCHAN, N. Hydroquinone from leaves of *Jacaranda mimosaeifolia*. **Phytochemistry** 12 (1): 220-221, 1973.
- SUGIYAMA, M. Genetic analysis of plant morphogenesis in vitro. **International Review of Cytology**, New York, v. 196, p. 67-84, 2000.
- SCATENA, V. L. & DIAS, E. S. Parênquima, colênquima e esclerênquima. APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. & CARMELLO-GUERREIRO, S. M. (Ed.) *In*: **Anatomia.Vegetal**. Viçosa: Editora UFV, 2004. p.109-119.



- TETSUMURA, T. & YUKINAGA, H. Comparative rooting of shoot tips of four japanese persimmon cultivars Vs. shoots regeneration from roots cultured in vitro. **HortScience**, V.35, p. 940-944, 2000.
- TYLICKI, A. Structural and ultrastructural analysis of *Solanum lycopersicoides* protoplast during diploid plant regeneration. **Annals of Botany**, Oxford, v. 90, n.2, p. 269-278, Aug. 2002.
- VIEIRA, M. F.; MEIRA, R. M. A.; QUEIROZ, L. P. & NETO, J. A. A. M., Polinização e Reprodução de *Jacaranda caroba* (Vell.) DC. (Bignoniaceae) em Área de Cerrado do Sudeste Brasileiro. **Anais do: 8º Congresso da SBSP**, 1992, p. 13-19.
- VIEIRA, R. F. *et al.* 2002. **Estratégias para conservação e manejo de recursos genéticos de plantas medicinais e aromáticas**. Resultados da 1ª Reunião Técnica; EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia / Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA)/Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).
- WETZEL, M. M. V. da S. **Época de dispersão e fisiologia de sementes do cerrado**. Brasília, 1997. 171 p. Tese (Doutorado em Ecologia) – Departamento de Ecologia, Universidade de Brasília.